

(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-37483

(P2001-37483A)

(43) 公開日 平成13年2月13日 (2001.2.13)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	特許出願公開番号
C 1 2 N 15/09	ZNA	C 1 2 N 15/00	ZNAA 4B 0 2 4
C 0 7 K 19/00		C 0 7 K 19/00	4B 0 5 0
C 1 2 N 1/21		C 1 2 N 1/21	4B 0 6 3
9/04		9/04	D 4B 0 6 5
C 1 2 Q 1/54		C 1 2 Q 1/54	4H 0 4 5
		審査請求 未請求	請求項の数12 O L (全 7 頁)

(21) 出願番号 特願平11-216459

(22) 出願日 平成11年7月30日 (1999.7.30)

(71) 出願人 596153357

早出 広司

東京都目黒区南1-13-16

(72) 発明者 早出 広司

東京都目黒区南1-13-16

(74) 代理人 100089705

弁理士 社本 一夫 (外5名)

最終頁に続く

(54) 発明の名称 連結型グルコース脱水素酵素

(57) 【要約】

【課題】 改良された熱安定性を有する改変型水溶性 PQQGDHを提供すること。

【解決手段】 リンカーペプチドを介して連結された2つの水溶性PQQGDHのサブユニットを含有する融合蛋白質。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 リンカーペプチドを介して連結された2つの水溶性PQQGDHのサブユニットを含有する融合蛋白質。

【請求項2】 前記リンカーペプチドが5アミノ酸以上の長さである、請求項1記載の融合蛋白質。

【請求項3】 前記水溶性PQQGDHが*Acinetobacter calcoaceticus*由来水溶性PQQGDHである、請求項1または2に記載の融合蛋白質。

【請求項4】 リンカーペプチドが次の配列  
Glu-Leu-Gly-Thr-Arg-Gly-Ser-Ser-Arg-Val-Asp-Leu-Gln

を有する、請求項1-3のいずれかに記載の融合蛋白質。

【請求項5】 リンカーペプチドが次の配列  
Gly-Gly-Gly-Gly-Ser

を有する、請求項1-3のいずれかに記載の融合蛋白質。

【請求項6】 リンカーペプチドが次の配列  
Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser

を有する、請求項1-3のいずれかに記載の融合蛋白質。

【請求項7】 請求項1-6のいずれかに記載の融合蛋白質をコードする遺伝子。

【請求項8】 請求項7に記載の遺伝子を含むベクター。

【請求項9】 請求項7に記載の遺伝子を含む形質転換体。

【請求項10】 請求項7に記載の遺伝子が生染色体に組み込まれた生物。

【請求項11】 請求項1-6のいずれかに記載の融合蛋白質を含むグルコースアクセシキット。

【請求項12】 請求項1-6のいずれかに記載の融合蛋白質を含むグルコースセンサー。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明はピロロキノリンキノン(PQQ)を補酵素とするグルコース脱水素酵素(GDH)のサブユニットが2つタンデムに連結された連結型ダイマーGDHに関する。本発明の連結型PQQGDHは、臨床検査や食品分析などにおけるグルコースの定量に有用である。

【0002】

【従来の技術】 PQQGDHは、ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素であり、グルコースを酸化してグルコラクトンを生成する反応を触媒する。

【0003】 PQQGDHには、膜結合性酵素と水溶性酵素があることが知られている。膜結合性PQQGDH

は、分子量約87kDaのシングルペプチド蛋白質であり、種々のグラム陰性菌において広く見いだされている。一方、水溶性PQQGDHは*Acinetobacter calcoaceticus*のいくつかの株においてその存在が確認されており(*Biosci. Biotech. Biochem.* (1995), 59(8), 1548-1555)、その構造遺伝子がクローニングされアミノ酸配列が明らかにされている(*Mol. Gen. Genet.* (1989), 217:430-436)。A. *calcoaceticus*由来水溶性PQQGDHは、ペリプラズムに局在する、分子量約50kDaの2つの同一のサブユニットからなるホモダイマーである。PQQGDH活性は、ホモダイマー酵素が形成される場合にのみ発現され、サブユニット単独ではPQQGDH活性を示さないことが報告されている。水溶性PQQGDHの生理学的役割はまだよく解明されていない。

【0004】 血中グルコース濃度は、糖尿病の重要なマーカーとして臨床診断上極めて重要な指標である。また、微生物を用いる発酵生産におけるグルコース濃度の定量がプロセスモニタリングにおいて重要な項目となっている。従来、グルコースはグルコースオキシダーゼ(GOD)あるいはグルコース6リン酸脱水素酵素(G6PDH)を用いる酵素法により定量されていた。しかし、GODを用いる方法ではグルコース酸化反応にともない発生する過酸化水素を定量するためカラーゼあるいはパーオキシダーゼをアクセシ系に添加するの必要があった。またGODを用いるバイオセンサーの開発も進められてきたが、反応が水溶液中の溶解酵素濃度に依存することから高濃度のグルコース試料には適さないこと、あるいは溶解酵素濃度によって測定値に誤差が生じる可能性があった。一方、G6PDHは分光学的手法に基づくグルコース定量に用いられてきたが、反応系に補酵素であるNAD(P)を添加しなければならないという煩雑性があった。そこで、これまでのグルコース酵素定量方法に用いられてきた酵素にかわる新たな酵素としてPQQGDHの応用が注目されている。PQQGDHはグルコースに対して高い酸化活性を有していること、およびPQQGDHは補酵素結合型の酵素であるため電子受容体として酵素を必要としないことから、グルコースセンサーの認識素子をはじめとして、アクセシ分野への応用が期待されている。しかしながら、PQQGDHはGODと比較して熱安定性が低いという問題点があった。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】 したがって、本発明は、改良された熱安定性を有する変型水溶性PQQGDHを提供することを目的とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】 本発明者は、2つの水溶性PQQGDHのサブユニットをタンデムに連結した融

合蛋白質を形成することにより、酵素のホモダイマー構造を安定化しうることを見いだして、本発明を完成した。

【0007】すなわち、本発明は、リンカーペプチドを介して連結された2つの水溶性PQQGDHのサブユニットを含有する融合蛋白質を提供する。好ましくは、該リンカーペプチドは5アミノ酸以上の長さである。

【0008】本発明はまた、本発明の融合蛋白質をコードする遺伝子、ならびに該遺伝子を含むベクターおよび形質転換体、および該遺伝子が主染色体に組み込まれた生物を提供する。本発明はまた、本発明の融合蛋白質を含むグルコースアッセイキット、ならびにグルコースセンサーを提供する。

【0009】本発明の連結型PQQGDHは、高い熱安定性を有することから、グルコースアッセイキットならびにグルコースセンサーにおいて用いるのに有用である。

【0010】  
【発明の実施の形態】連結型GDHの構造

本発明の連結型GDHは、2つの水溶性PQQGDHのサブユニットがタンデムに連結された構造を有する融合蛋白質である。本発明に従う連結型GDHは、改良された熱安定性を有する。

【0011】天然の水溶性PQQGDHは、2つのサブユニットからなるホモダイマー構造を有する。本発明者は現在のところ、本発明の連結型GDHの増加した熱安定性は、この2つのサブユニットが融合蛋白質として発現されることにより、ダイマーの高度構造が安定化されたためであると考えている。

【0012】本発明の連結型GDHにおいては、2つのサブユニットはインフレームで融合されたリンカーを介してタンデムに連結されている。好ましくは、該リンカーペプチドは5アミノ酸以上の長さである。より好ましくは10アミノ酸以上、さらに好ましくは13アミノ酸以上の長さである。リンカー領域は、2つのサブユニットが正しいコンフォメーションで結合するためある程度の長さを有することが必要であると考えられる。リンカーペプチドの長さの上限としては特に制限はないが、本発明の連結型GDHの酵素活性または細胞内局在化に有害な配列を有するものであてはならない。

【0013】また好ましくは、リンカー領域のアミノ酸配列は蛋白質加水分解を受けやすいことが知られている部分配列を含まないよう設計すべきである。各サブユニットにおいては、アミノ酸残基の一部が欠失または置換されていてもよく、また他のアミノ酸残基が付加されていてもよい。特定の領域のアミノ酸残基を他のアミノ酸残基で置換することにより、酵素の熱安定性や基質に対する親和性を改良することができる(たとえば、特開平10-243786、特開平11-101143、特開平11-124285を参照)。これらの欠失、置換

または付加は、サブユニットの一方または両方へ導入することができ、これらの改変されたサブユニットが連結された連結型PQQGDHも本発明の範囲内である。

【0014】好ましくは、水溶性PQQGDHのサブユニットはAcinetobacter calcoaceticus由来の水溶性PQQGDHである。当業者は、他の細菌に由来する水溶性PQQGDHについても、本発明の教示にしたがってサブユニットを連結して発現させることにより、本発明の融合蛋白質を得ることができる。これらの連結型PQQGDHも本発明の範囲内である。

#### 連結型GDHの製造方法

図1は、本発明の連結型GDHの概要およびこれをコードするベクターの構築方法を示す。本発明の連結型GDHは、PQQGDHの2つのサブユニットをリンカーペプチドを介して連結させたインフレーム融合を行うことにより作成することができる。Acinetobacter calcoaceticus由来の天然の水溶性PQQGDHをコードする遺伝子の配列は、Mol. Genet. (1989), 217:430-436に開示される。

【0015】本発明の連結型GDHをコードする遺伝子を、2つの水溶性PQQGDHのサブユニットをコードする遺伝子を、適当な長さのリンカーをコードする遺伝子を介して連結することにより構築する。このとき、各サブユニットとリンカーとがインフレームで融合蛋白質として発現されるように連結する。リンカーとしては、天然または合成の任意の配列を用いることができる。例えば、ベクター中の適当な配列を用いてもよく、合成遺伝子を調製してもよく、あるいは、適当なプライマーを用いるPCRにより、各サブユニットの上流または下流に所望の配列を伸長させてもよい。このような遺伝子操作のための種々の方法は、当該技術分野において知られている。このようにして得た連結型GDHをコードする遺伝子を遺伝子発現用のベクター(例えばプラスミド)に挿入し、これを適当な宿主(例えば大腸菌)に形質転換する。外来性蛋白質を発現させるための多くのベクター・宿主系が当該技術分野において知られており、宿主としては例えば、細菌、酵母、培養細胞などの種々のものを用いることができる。

【0016】上述のようにして得られた、連結型GDHを発現する形質転換体を培養し、培養液から遠心分離などで菌体を回収した後、菌体をフレンチプレスなどで破壊する。これを超遠心分離し、PQQGDHを含む水溶性画分を得ることができる。あるいは、適当な宿主ベクター系を用いることにより、発現したPQQGDHを培養液中に分泌させることもできる。得られた水溶性画分を、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、HPLCなどにより精製することにより、本発明の連結型GDHを調製する。

### 酵素活性の測定方法

本発明の連結型GDHは、PQQを補酵素として、グルコースを酸化してグルコノラクトンを生成する反応を触媒する作用を有する。

【0017】酵素活性の測定は、PQQGDHによるグルコースの酸化にもなって還元されるPQQの量を酸化還元色素の呈色反応により定量することができる。呈色試薬としては、例えば、PMS（フェナジンメトサルフェート）-DCIP（2,6-ジクロロフェノールインドフェノール）、フェリシアン化カリウム、フェロセンなどを用いることができる。

### 熱安定性

本発明の連結型GDHの熱安定性は、酵素を高温（例えば55℃）でインキュベートし、一定時間ごとにアリコトを取り出して酵素活性を測定し、時間経過にもなる酵素活性の低下をモニターすることにより評価することができる。あるいは、種々の温度で一定時間インキュベートした後の残存活性を測定することにより評価することができる。

【0018】本発明の連結型GDHは、野生型PQQGDHと比較して高い熱安定性を有することを特徴とする。このため、酵素生産において調製/精製時の失活が少なく収率が高い、溶液中での安定性が高く酵素の保存が容易である、本酵素を用いてアッセイキットあるいは酵素センサーを作成する過程において失活が少なく、本酵素を用いて作成されたアッセイキットあるいは酵素センサーの熱安定性が高いことから、保存性に優れたなどの利点を有する。

### グルコースアッセイキット

本発明はまた、本発明に従う連結型GDHを含むグルコースアッセイキットを特徴とする。本発明のグルコースアッセイキットは、本発明に従う連結型GDHを少なくとも1回のアッセイに十分な量で含む。典型的には、キットは、本発明の連結型GDHに加えて、アッセイに必要な緩衝液、メディエーター、キャリブレーションカーブ作製のためのグルコース標準溶液、ならびに使用の手引を含む。本発明に従う連結型GDHは種々の形態で、例えば、凍結乾燥された試薬として、または適切な保存溶液中の溶液として提供することができる。好ましくは本発明の連結型GDHはホロ化した形態で提供されるが、アポ酵素の形態で提供し、使用時にホロ化することもできる。

### グルコースセンサー

本発明はまた、本発明に従う連結型GDHを用いるグル

コースセンサーを特徴とする。電極としては、カーボン電極、金電極、白金電極などを用い、この電極上に本発明の酵素を固定化する。固定化方法としては、架橋試薬を用いる方法、高分子マトリックス中に封入する方法、透析膜で被覆する方法、光架橋性ポリマー、導電性ポリマー、酸化還元ポリマーなどがあり、あるいはフェロセンあるいはその誘導体に代表される電子メディエーターとともにポリマー中に固定あるいは電極上に吸着固定してもよく、またこれらを組み合わせて用いてもよい。好ましくは本発明の連結型GDHはホロ化した形態で電極上に固定化するが、アポ酵素の形態で固定化し、PQQを別の層としてまたは溶液中で提供することもできる。典型的には、グルタルアルデヒドを用いて本発明の連結型GDHをカーボン電極上に固定化した後、アミン基を有する試薬で処理してグルタルアルデヒドをブロックする。

【0019】グルコース濃度の測定は、以下のようにして行うことができる。恒温セルに緩衝液を入れ、PQQおよびCaCl<sub>2</sub>、およびメディエーターを加えて一定温度に維持する。メディエーターとしては、フェリシアン化カリウム、フェナジンメトサルフェートなどを用いることができる。作用電極として本発明の連結型GDHを固定化した電極を用い、対極（例えば白金電極）および参照電極（例えばAg/AgCl電極）を用いる。カーボン電極に一定の電圧を印加して、電流が定常になった後、グルコースを含む試料を加えて電流の増加を測定する。標準濃度のグルコース溶液により作製したキャリブレーションカーブに従い、試料中のグルコース濃度を計算することができる。

### 【0020】

【実施例】以下、実施例に基づいて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

### 実施例1

#### 連結型GDHの構築

連結型GDHの構築方法ならびにリンカー領域の一次構造を図1に示す。連結型GDHを構築するためのそれぞれのフラグメントは、*A. calcoaceticus* LMD79.41 (The Netherlands Culture Collection) 由来の天然のPQQGDH構造遺伝子をテンプレートとして、所望の制限酵素部位を含むように、PCR反応により増幅した。PCR反応には、次の2組のオリゴヌクレオチドプライマーを用いた。

#### 第1フラグメント (Nco I/Sac I)

フォワード 5'-GGCCATGGATAAACAATTTATGGCTAAATTCCTTTAT-3'  
リバーズ 5'-GGGAGCTCTCTAGCCCTTATAGGTGAACCTTAATGAG-3'

#### 第2フラグメント (Pst I/Hind III)

フォワード 5'-GGCTCGACGGTTCCTCTAACTCCATCTCAATTTGCTAAA-3'  
リバーズ 5'-GGAGCTTTTACTTAGCCTTATAGGTGAACCTTAATGAG-3'

これらのフラグメントを、発現ベクターpTrc99A (Pharmacia社)の2つのクローニング部位にタンデムに挿入した。終止コドンをもたない第1フラグメントをNcoI/SacI部位に挿入し、終止コドンをもつ第2のフラグメントをPstI/HindIII部位に挿入した。得られたプラスミドpLGB1は、GDHをコードする2つの領域がリンカー領域を介してインフレームでタンデムに連結されている融合蛋白質をコードする。リンカー領域は、発現ベクターのマルチクローニング部位の配列に由来するものであり、 $\beta$ -ガラクトシダーゼの部分配列の13アミノ酸残基をコードする。遺伝子配列決定により、所望の配列を有する遺伝子が得られたことを確認した。

【0021】対照としては、野生型PQQGDHをコードする遺伝子が同じ発現ベクターpTrc99Aに挿入されているプラスミドpGB2を用いた。

#### 実施例2

##### 連結型GDHの製造および精製

宿主細胞としては、挿入変異によりPQQGDH構造遺伝子が壊されている*E. coli* PP2418株 (Cleton-Jansen et al., 1990)を用いた。この株を実施例1で得られたプラスミドpLGB1および対照プラスミドpGB2でそれぞれトランスフォームし、各形質転換体をLBブロス中で600nm PQQおよび5mM  $\text{CaCl}_2$ の存在下で37°Cで好気的に培養した。中期対数増殖期で0.3mM IPTGを加え、さらに30°Cで後期対数増殖期まで培養した。細胞を回収し、10mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) 中でフレンチプレスにより破壊し (110MPa)、超遠心分離 (160,500g, 1h, 4°C) を行った。酵素活性は水溶性画分に認められた。この画分を回収し、10mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) で透析した。

#### 実施例3

##### 連結型GDHの分子量の測定

実施例2で得られた粗精製酵素を、10mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) で平衡化したカチオン交換クロマトグラフィー (CM-Toyopearl 650M) に供し、0.8M  $\text{NaCl}$ /10mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) で溶出した。活性を示す画分を非変性条件下でゲル透過クロマトグラフィー (G-3000, トーソー社) に供したところ、活性画分は、連結型GDHについて予測されるところ、約100kDaの分子量を有していた。しかし、さらにSDS-PAGEにより分析したところ、この画分は分子量50kDaの蛋白質を少量含有していた。これは、インビボでの蛋白質分解により、または精製工程の間に融合蛋白質が分解されて、50kDaのPQQGDHのサブユニットが生じたためと考えられる。この分解生成物を分離除去するため、活性画分をさらに2.0mM グアニジン-HClの存在

下でゲル透過クロマトグラフィーに供して、分子量100kDaの蛋白質のみを含有するGDH活性画分を得た (図2)。このようにして得られた画分を連結型GDH酵素標品として以下の実験に用いた。

#### 実施例4

##### 酵素アッセイ

酵素活性は、酵素を10mM MOPS緩衝液 (pH 7.0) 中で、1mM  $\text{CaCl}_2$ および1 $\mu$ M PQQの存在下で室温で10分間インキュベートした後、0.6mM フェナジメトサルフェート、0.06mM 2,6-ジクロロフェノールインドフェノール (DCIP) の存在下で、25°Cで600nmの吸光度の減少速度を測定することにより測定した。

【0022】グルコース濃度10-1000mMの範囲でアッセイを行い、連結型GDHの速度論的パラメータを算出した。連結型GDHのグルコースに対する $K_m$ 値およびラクトースに対する $K_m$ 値はそれぞれ20mMおよび12mMであり、天然型ダイマーPQQGDHとはほぼ同様であった (Mathushita et al., 1995; Olsthoorn et al., 1996, 1998)。

【0023】また、連結型GDHのグルコースに対する $V_{max}$ 値は897U/mgであり、ラクトースに対する $V_{max}$ 値は467U/mgであった。天然のダイマーPQQGDHの触媒活性はこれまでに複数の報告があり、酵素の調製方法およびアッセイ方法に依存して、3000U/mgから7400U/mgの範囲である (Mathushita et al., 1995; Olsthoorn et al., 1996, 1998)。すなわち、連結型GDHは天然のダイマーPQQGDHの10-30%程度の触媒活性を有する。この値は、グルコースセンサーに一般に用いられているグルコースオキシダーゼの5-10倍高いものであり、バイオセンサーにおいて適用するのに十分な触媒活性である。

#### 実施例5

##### 熱安定性の評価

連結型GDHおよび野生型GDHを、10mM MOPS緩衝液 (pH 7.0) 中で、30-70°Cの指示された各温度で20分間処理し、次に4°Cで2分間冷却した後、室温で残存酵素活性を測定した。

【0024】結果を図3に示す。試験した温度範囲においては、連結型GDHは野生型ダイマーGDHより高い残存活性を示した。これらの結果は、連結型GDHが野生型ダイマーGDHよりはるかに高い熱安定性を有することを表す。

#### 実施例6

##### 合成リンカーにより連結された連結型GDH

実施例1で得られたプラスミドpLGB1の、連結型GDHの $\beta$ -ガラクトシダーゼ由来の13アミノ酸からなるリンカー部分: Glu-Leu-Gly-Thr-Arg-Gly-Ser-Ser-Ser-Ar

g-Val-Asp-Leu-Glnをコードする配列を、それぞれ

Gly-Gly-Gly-Ser

および

Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Ser

をコードする二本鎖合成オリゴヌクレオチドで置き換えて、合成リンカー連結型GDHをコードするプラスミドを作成した。これらのプラスミドを用いて、実施例2と同様に精製酵素を調製した。これらの合成リンカー連結型GDHはいずれも、実施例2で得られた連結型GDHと匹敵する酵素活性および熱安定性を示した。

実施例7

酵素センサーの作製および評価

5 Uの連結型GDHにカーボンペースト20 mgを加えて凍結乾燥させた。これをよく混合した後、既にカーボンペーストが約40 mg充填されたカーボンペースト電

極の表面だけに充填し、濾紙上で研磨した。この電極を1%のグルタルアルデヒドを含む10 mM MOPS緩衝液(pH 7.0)中で室温で30分間処理した後、20 mM リジンを含む10 mM MOPS緩衝液(pH 7.0)中で室温で20分間処理してグルタルアルデヒドをブロッキングした。この電極を10 mM MOPS緩衝液(pH 7.0)中で室温で1時間以上平衡化させた。電極は4℃で保存した。

【0025】 作製した酵素センサーを用いてグルコース濃度の測定を行った。本発明の連結型GDHを固定化した酵素センサーを用いて、0.1 mM-5 mMの範囲でグルコースの定量を行うことができる。

【0026】

【配列表】

# SEQUENCE LISTING

```
<110>: Sode, Koji
<120>: Linked Glucose Dehydrogenase
<130>: 990388
<160>: 4
<170>: Patent In Ver. 2.0
<210>: 1
<211>: 38
<212>: DNA
<213>: Acetobacter calcoaceticus
<400>: 1
ggccatggat aaacatttat tggctaaat tgccttat      38
<210>: 2
<211>: 35
<212>: DNA
<213>: Acetobacter calcoaceticus
<400>: 2
ggagactct tagccttata ggtgaactta atgag      35
<210>: 3
<211>: 38
<212>: DNA
<213>: Acetobacter calcoaceticus
<400>: 3
ggctgcaggt tcctctaact ccatctcaat ttgctaaa      38
<210>: 4
<211>: 38
<212>: DNA
<213>: Acetobacter calcoaceticus
<400>: 4
ggagactttt acttagcctt ataggtgaac ttaatgag      38
```

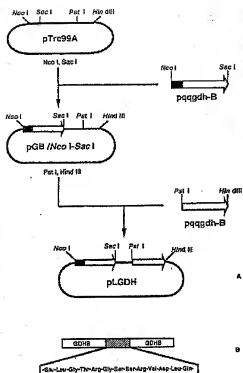
【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、本発明の連結型GDHをコードするベクターの構築方法およびリンカー領域の一次構造を示す。

【図2】 図2は、本発明の連結型GDHのゲル電気泳動図である。

【図3】 図3は、本発明の連結型GDHと対照GDHの熱安定性を示すグラフである。

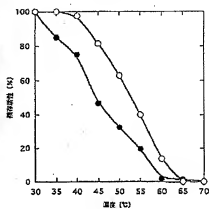
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

Fターム(参考) 4B024 AA11 AA20 BA08 CA03 DA05  
 DA06 EA04 GA11 HA01  
 4B050 CC03 DD02 LL03  
 4B063 QA01 QA18 QQ03 QR04 QR65  
 QS02 QX01  
 4B065 AA04Y AA26X AB01 AC14  
 BA02 CA28 CA46  
 4H045 AA10 AA30 BA10 CA11 DA89  
 EA50 FA72 FA74

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-037483

(43)Date of publication of application : 13.02.2001

(51)Int.Cl.

C12N 15/09

C07K 19/00

C12N 1/21

C12N 5/04

C12Q 1/54

(21)Application number : 11-216459

(71)Applicant : HAYADE KOJI

(22)Date of filing : 30.07.1999

(72)Inventor : HAYADE KOJI

## (54) LINKED GLUCOSE DEHYDROGENASE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a new enzyme which is obtained by linking water-soluble glucose dehydrogenase subunits via a linker peptide, requires pyrrolo-quinoline quinone as a coenzyme, has good thermal stability, and can be used for quantitatively determining glucose and the like.

SOLUTION: This is a new enzyme (fused protein) which is obtained by linking two water-soluble glucose dehydrogenase (GDH) subunits via the linker peptide having an amino acid sequence, for example, shown by the formula, requires pyrrolo-quinoline quinone (PQQ) as a coenzyme, has improved thermal stability, and is useful for quantitatively determining glucose in clinical diagnosis, food analysis, and so on. This enzyme is obtained by preparing two fragments by PCR using two pairs of primers so as to contain a desired restriction enzyme site using a natural pyrrolo-quinoline quinone glucose dehydrogenase (PQQGDH) gene derived from *Acinetobacter calcoaceticum* as a template, followed by incorporating both into a vector to express in a host cell.

G<sup>+</sup>-Leu-Gly-Thr-Ile-Gly-Ser-Ser-Arg-Phe-Ileu-Gly

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C), 1998,2003 Japan Patent Office